

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
18 septembre 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/075885 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : A61K 9/06

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR03/00797

(22) Date de dépôt international : 12 mars 2003 (12.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/03059 12 mars 2002 (12.03.2002) FR  
60/405,720 26 août 2002 (26.08.2002) US

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ETHY-  
PHARM [FR/FR]; 21, rue Saint Mathieu, F-78550 Houdan  
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LEROUX,  
Jean-Christophe [CA/CA]; 329 Notre Dame E, Apt  
237, Montreal, Quebec (CA). COUFFIN-HOARAU,  
Anne-Claude [FR/CA]; 3671 Drolet, Montreal, Quebec,  
H2X 3H7 (CA).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17  
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un  
brevet (règle 4.17.ii)) pour les désignations suivantes AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,  
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL,  
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT,  
TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, brevet ARIPO  
(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,  
FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI,  
SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- relative au droit du déposant de revendiquer la priorité  
de la demande antérieure (règle 4.17.iii)) pour toutes les  
désignations
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US  
seulement

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avec revendications modifiées

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITION HAVING GELLING PROPERTIES FOR THE PROLONGED DELIVERY OF BIOACTIVE SUB-  
STANCES

(54) Titre : COMPOSITION A PROPRIETES GELIFIANTES DESTINEE A LA DELIVRANCE PROLONGEE DE  
SUBSTANCES BIO-ACTIVES

(57) Abstract: The invention relates to a heat-sensitive composition in liquid form, containing: an organic hydrophobic liquid; an organogelling substance, the molecules of which can be bound to one another by low energy linkages; and a bioactive substance, which switches to organogel form upon coming into contact with a physiological liquid during the administration thereof into an animal body and, in particular, a human.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition thermosensible sous forme liquide contenant un liquide organique hydrophobe, une substance organogélificatrice dont les molécules ont la capacité de se lier entre elles par liaisons de faible énergie, et une substance bioactive, qui passe sous forme d'organogel lorsqu'elle entre en contact avec un liquide physiologique, lors de son administration à un corps animal, en particulier l'homme.

WO 03/075885 A1

## COMPOSITION A PROPRIETES GELIFIANTES DESTINEE A LA DELIVRANCE PROLONGEE DE SUBSTANCES BIO-ACTIVES.

La présente invention concerne une composition chimique thermosensible comportant un solvant organique hydrophobe, une substance dite organogélatrice, et une substance bioactive, ladite composition étant destinée à être administrée à un organisme vivant, pour la délivrance prolongée de substances bioactives.

Ladite composition a la capacité de former un organogel de façon spontanée ou par refroidissement, une fois mise au contact d'un milieu aqueux, et notamment, un liquide physiologique. Ledit organogel formé sert de support à la libération prolongée de substances bioactives par diffusion et/ou par érosion et/ou biodégradation progressive dudit organogel dans l'organisme.

La présente invention s'étend également aux utilisations qui peuvent être faites de cette composition dans le domaine thérapeutique et plus particulièrement dans le domaine de la délivrance prolongée de substances bioactives.

On entend par composition thermosensible, toute composition capable de passer de l'état liquide à l'état gel en fonction de la température et par organogel tout gel dont la phase liquide est composée par un solvant organique.

Par ailleurs, on entend par substance bioactive, toute substance ayant la capacité d'agir sur un organisme vivant ou son fonctionnement de façon à prévenir, guérir, soulager ou améliorer l'état dudit organisme.

On entend par liquide organique hydrophobe, un solvant ou un mélange de solvants organique(s) dont les molécules ou les parties de molécules présentent une certaine répulsion vis-à-vis des molécules d'eau. On entend par solvant hydrophile, un solvant dont les molécules établissent des interactions d'attraction avec les molécules d'eau.

Les gels sont depuis longtemps utilisés dans le domaine de l'industrie pour les propriétés que leur confère leur structure physique particulière.

En effet, ils correspondent à un état intermédiaire de la matière car ils sont composés à la fois d'éléments sous forme solide et d'éléments sous forme liquide. Les éléments solides formant une structure tridimensionnelle ou matrice, organisée en réseau de molécules interconnectées entre elles, ce  
5 réseau immobilisant les éléments présents sous forme liquide.

On peut classer les gels en fonction du type de liaisons qui relie entre elles les molécules de la phase solide ou en fonction du type de solvant, organique ou aqueux qui compose la phase liquide.

On appelle hydrogels, les gels dont la phase liquide est une phase  
10 aqueuse, pour les différencier des organogels dont la phase liquide est une phase organique.

Les gels dont la matrice est constituée de molécules liées entre elles par des liaisons covalentes sont généralement dans un état stable et irréversible une fois formés. A l'inverse, les gels dont la matrice solide est obtenue par des  
15 liaisons de faible énergie (type liaisons hydrogène ou liaisons de Van der Waals notamment), sont généralement des gels réversibles c'est-à-dire pouvant passer de l'état gel à l'état liquide en fonction des conditions environnantes (pH, température, force ionique etc.).

Dans le cas des gels thermosensibles, la température à laquelle est  
20 observé le changement d'état est appelée température de transition. Dans le cas particulier des systèmes présentant un comportement d'hystérèse, la température de transition gel/liquide est différente de la température de transition liquide/gel.

Ainsi, les gels sont notamment utilisés dans l'industrie pharmaceutique,  
25 pour leur capacité de rétention vis-à-vis de molécules bioactives, notamment dans le cadre d'une administration de substances actives par voie transcutanée.

Cette propriété de rétention a par ailleurs été exploitée pour une utilisation des gels comme vecteurs de délivrance prolongée de médicaments.

30 Ainsi, le brevet US N° 3,932,624 décrit l'utilisation d'un hydrogel destiné à la délivrance retard de saralazine. Dans ce brevet, le gel est réalisé à base de gélatine, qui, diluée dans une solution de sérum physiologique contenant la

substance bioactive va s'en imprégner pour former une structure gélifiée qui pourra être implantée dans l'organisme par voie chirurgicale au niveau sous cutané. Le gel implanté libère de façon progressive la substance active qu'il contient par érosion progressive dudit gel.

5           Cependant, ce type d'utilisation nécessite d'implanter *in situ* par voie chirurgicale, un gel préalablement formé. Cette opération reste donc à la fois coûteuse et contraignante pour le patient.

Pour pallier cet inconvénient, des hydrogels se formant *in situ* ont été développés.

10           Ainsi, récemment, la demande de brevet US N° 20010007673 décrit l'utilisation d'un hydrogel se formant *in vivo* destiné à la délivrance retard de molécules bioactives, notamment de protéines. Une composition à base de polymère hydrophile incluant l'alginate, d'un ion métallique polyvalent et de la substance active désirée, est injectée sous forme liquide et passe sous forme  
15           gel une fois placée dans l'organisme. De plus, de par la nature trixotrope de la composition à l'état gel, il est possible d'injecter la composition à l'état gel, par exemple à partir d'une seringue par application d'une certaine pression, après quoi la composition retourne à l'état de gel dans l'organisme. Cet hydrogel permet une diffusion retardée de la substance bioactive dans les liquides de  
20           l'organisme.

Par ailleurs, le brevet US n° 5 575 815 décrit l'administration intracavitaire, i.e. intra-artérielle ou intraveineuse, d'une composition liquide aqueuse qui se transforme ou se viscosifie en hydrogel *in vivo*. L'utilisation de ce gel pour l'incorporation de substances actives est prévue, notamment pour  
25           l'angioplastie. Les hydrogels utilisés sont constitués de polymères polyéthers.

Le brevet US n°6 344 488 décrit la formation d'un gel contrôlé par la température et dépendant du pH, comprenant un mélange aqueux chitosan/ sel d'organophosphate. L'addition d'un sel mono-phosphate dibasique de polyol ou de sucre à des solutions aqueuses de chitosan conduit à une gélification  
30           contrôlée par la température et dépend du pH. Les médicaments sont incorporés audit gel avant la gélification. Les solutions de chitosan/sel d'organophosphate sont stockées à basses températures sous forme de

solution et gélifient in situ après injection sous cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire suite à une augmentation de la température. L'hydrogel ainsi formé peut être utilisé pour la libération de principes actifs.

La demande de brevet WO 97/15287 décrit un système et une méthode  
5 pour l'administration parentérale (intramusculaire, intrapéritonéale, subcutanée) de médicament dans une matrice polymère biodégradable à un animal à sang chaud sous forme de liquide résultant en la formation d'un dépôt de gel, pour la libération contrôlée du médicament. Le liquide est une solution aqueuse dans laquelle est dissoute ou dispersée une quantité efficace de médicament  
10 contenu dans une matrice de bloc copolymère biodégradable. Le copolymère a une température de gélification inverse inférieure à la température du corps de l'animal auquel il est administré et est fait d'un bloc polymère hydrophobe et d'un bloc polymère hydrophile.

D'autres solutions aqueuses thermogélifiantes sont décrites dans la  
15 littérature. Parmi celles-ci, on retrouve les solutions de poloxamers (Johnston, T.P. et al., Inulin disposition following intramuscular administration of an inulin/poloxamer gel matrix, J. Parent. Sci. Technol., vol. 43, 279, 1989 ; Johnston, T.P. et al., Sustained delivery of interleukin-2 from a poloxamer 407 gel matrix following intraperitoneal injection in mice, Pharm. Res. 9, 425, 1992;  
20 Pec et al., Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat, J. Pharm. Sci. Vol.81, 626, 1992) et les solutions de xyloglucan (Miyazaki, S. et al., Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery., J. Controlled Release, vol 56, 75, 1998).

25 Cependant, le principal inconvénient de ces hydrogels réside dans leur faible efficacité relative à la délivrance sur de longues périodes de temps de substances bioactives hydrophiles. Cela est dû notamment à leur importante proportion en eau qui leur confère une forte porosité, conduisant les substances bioactives hydrophiles présentes dans de tels gels à être relativement vite  
30 éliminées dans la circulation. Ce phénomène de diffusion est particulièrement important pour des molécules de petite taille très hydrophiles telles que certains médicaments hydrophiles ou certains peptides hydrophiles par exemple.

L'efficacité de la libération prolongée de ces substances s'en trouve donc réduite.

L'objet de la présente invention est de fournir une nouvelle composition pharmaceutique ayant la capacité de former un organogel permettant la libération sur de longues périodes de temps de substances actives.

De plus, l'objet de la présente invention est également de fournir un tel support de libération retardée à la fois biocompatible et biodégradable permettant en outre d'être administré sous forme liquide, c'est-à-dire de façon aisée, rapide et peu coûteuse.

Les organogels ont déjà été utilisés comme support permettant la libération retardée de principe actif.

La présente invention a pour objet un organogel hydrophobe généré in vivo après avoir été appliqué sous forme liquide. De tels gels ont déjà été décrits dans l'art antérieur.

La demande de brevet n° WO 94/08623 divulgue un organogel hydrophobe contenant de la lécithine et un solvant de la lécithine hydrophobe utilisé pour la libération retardée de protéine. Le gel se forme in vivo, à partir d'une solution injectée en intramusculaire ou en sous cutané, par absorption d'eau à partir du milieu interstitiel lors de l'injection.

Au contraire, l'organogel hydrophobe de la présente invention ne se forme pas par absorption de l'eau environnante.

La présente invention concerne une composition liquide thermosensible à propriétés gélifiantes comprenant un liquide organique hydrophobe, une substance dite organogélatrice, et une substance bioactive.

La substance organogélatrice est constituée de molécules capables de se lier entre elles par des liaisons de faible énergie si bien que l'auto-assemblage de ces molécules est avantageusement thermoréversible.

La composition thermosensible sous forme liquide selon l'invention contient un liquide organique hydrophobe, une substance organogélatrice dont les molécules ont la capacité de se lier entre elles par liaisons de faible énergie, et une substance bioactive. Elle passe sous forme d'organogel lorsqu'elle entre en contact avec un liquide physiologique, lors de son administration à un corps

animal, en particulier l'Homme, en particulier lors de l'injection dans l'organisme, par exemple à l'aide d'une seringue conventionnelle, par voie parentérale extra vasculaire, ou intramusculaire sous cutanée.

On entend par voie parentérale extra vasculaire toute voie de pénétration dans l'organisme autre que la voie digestive et la voie vasculaire (veines, artères et vaisseaux sanguins).

La composition de l'invention peut également être administrée par voie intra-oculaire, par voie intracavitaire ou sur des prothèses préalablement à leur application, par voie vaginale, sur une plaie ouverte ou lors d'une intervention chirurgicale.

De nombreux documents décrivent des compositions pour usage topique contenant des organogels à base de lécithines (voir par exemple US N° 6 306 383). La lécithine est un mélange de phospholipides de faible poids moléculaire. Les lécithines sont amphotères, elles sont solubles dans l'alcool et elles forment une émulsion avec l'eau. Les organogels de lécithine ont été décrits comme véhicules utiles pour faciliter la pénétration des molécules à faible poids moléculaire (Willimann, H., et autres, " Organogel lécithine comme matrice pour le transport transdermique des médicaments", J. Pharm. Sci., vol. 81, 1992). Les organogels de lécithine sont obtenus en ajoutant un peu d'eau à une solution de lécithine dans des solvants organiques tel que le palmitate d'isopropyle ou le cyclooctane. Dans ces documents, l'eau est ajoutée pour former le gel désiré si bien que l'organogel est formé avant son application sur la peau.

Au contraire, les organogels de la présente invention sont sous forme liquide quand on les administre à un organisme vivant et prennent la forme de gel une fois qu'ils entrent en contact avec un liquide physiologique. Par ailleurs, les lécithines ne constituent pas des substances organogélatrices telles que définies dans le cadre de la présente invention.

On entend par liquide physiologique, tout liquide circulant dans un corps animal, tel que par exemple le liquide lymphatique, le liquide lacrymal, le liquide céphalo-rachidien, le liquide amniotique, le liquide parentéral et le sang.

L'organogel formé à partir de la composition selon l'invention possède des capacités de rétention de molécules bioactives et plus particulièrement de molécules d'un poids inférieur à 100 000 dalton présentant un caractère hydrophile, permettant d'envisager une libération desdites molécules dans l'organisme sur des périodes supérieures à 3 jours.

Enfin, ledit organogel formé dans l'organisme à partir de la composition selon l'invention a la capacité de s'éliminer lentement par érosion et/ou biodégradation progressive, sans toxicité pour l'organisme où il est implanté.

Cette propriété de gélification *in situ* conforme à l'invention est obtenue par l'utilisation d'un liquide organique hydrophobe, constituant la phase organique dudit organogel et par une substance organogélatrice (ou organogélateur), constituant la matrice solide dudit organogel.

Les molécules constituant cette substance organogélatrice, sont du type notamment des dérivés esters d'acides gras d'acides aminés qui ont la capacité de s'auto-assembler spontanément pour former une matrice immobilisant ledit liquide organique hydrophobe. Cet auto-assemblage moléculaire peut se réaliser par des liaisons hydrogène s'établissant entre les groupements de type alcool (-OH), acide (-COOH), amine (-NH ou NH<sub>2</sub>) portés par les molécules organogélatrices.

Si nécessaire, la gélification de la composition liquide est induite par refroidissement du site d'application de la composition ou par diffusion d'un solvant organique hydrophile ajouté à la composition de l'invention.

La demanderesse a sélectionné des solvants organiques hydrophiles capables de créer des liaisons faibles (ex. : ponts hydrogène) avec les molécules de substance organogélatrice, et capables de diffuser dans les milieux aqueux pour réaliser la composition selon l'invention.

Ainsi, le solvant organique hydrophile, introduit dans le mélange formant la composition selon l'invention va entrer en compétition avec les molécules de substance organogélatrice, en créant avec lesdites molécules des liaisons faibles (ex. : ponts hydrogène) empêchant les dites molécules de s'auto-assembler en un réseau dense et uni. La composition selon l'invention restera



donc sous forme liquide tant que les molécules dudit solvant organique hydrophile resteront liées aux molécules de l'organogélateur.

L'utilisation selon la présente invention de la réversibilité des liaisons faibles va avantageusement permettre à la matrice organogélatrice de se ré-assembler dès lors que ledit solvant organique hydrophile aura diffusé dans le milieu environnant.

Ainsi, dès son entrée en contact avec une solution aqueuse et plus particulièrement avec les liquides physiologiques tels que le liquide interstitiel, la lymphe ou le liquide intra péritonéal par exemple, ledit solvant organique hydrophile présent dans la composition conforme à l'invention va diffuser dans ledit liquide environnant du fait de son hydrophilie.

La diffusion dudit solvant organique hydrophile va alors permettre l'auto-assemblage des molécules de ladite substance organogélatrice. Cet auto-assemblage, en créant un réseau structuré, va permettre la rétention dudit liquide organique hydrophobe, faisant passer ladite composition de l'état liquide à l'état gel.

La présente invention offre donc un système simple de gélification *in situ* spontanée, et d'administration aisée.

Par ailleurs, la présente invention repose sur les propriétés d'hystérèse observées par la demanderesse sur des organogels à base de substances organogélatrices conformes à l'invention. On entend par hystérèse le phénomène physique observé notamment pour les compositions gélifiables, représentant l'écart existant entre la température de transition gel/liquide et la température de transition liquide/gel. Ces propriétés permettent en effet de concevoir une composition conforme à l'invention qui soit liquide, donc facilement injectable, à température ambiante (ou à une température avoisinant la température ambiante). De plus, ces propriétés permettent également de réaliser un organogel selon l'invention qui, une fois formé *in vivo*, va rester sous forme gel à la température corporelle de l'organisme considéré. En effet, un tel organogel, qu'il soit formé par diffusion ou simple refroidissement, possède une température de transition gel/liquide supérieure à la température du site

d'injection ou d'application. De ce fait, il est parfaitement stable dans ledit organisme.

Enfin, la présente invention a l'avantage de fournir un support de libération prolongée de médicaments ou d'autres substances actives. En effet, l'organogel formé dans l'organisme et conforme à la présente invention comporte une véritable structure matricielle organisée qui a peu d'affinité pour le milieu aqueux environnant et permet donc une libération lente de la substance active par diffusion, érosion ou biodégradation progressive dudit organogel.

La présente invention fournit donc un support simple, efficace et facile d'administration permettant une libération prolongée dans l'organisme, d'une période au moins égale à 1 jour, de substances telles que des substances bioactives et plus particulièrement de molécules à caractère hydrophile d'un poids inférieur à 100 000 dalton.

En outre, la composition selon la présente invention a l'avantage d'être extrêmement peu coûteuse, tant sur le plan de la fabrication comme cela est décrit plus loin, que sur le plan du conditionnement et de l'administration.

Les substances organogélatrices conformes à l'invention sont des substances dont les molécules ont la capacité de se lier entre elles par liaisons de faible énergie, et notamment par liaisons hydrogène, permettant la formation d'une matrice thermosensible. Ces molécules sont notamment des molécules de faible poids moléculaire présentant des extrémités acide (-COOH) ou alcool (-OH) ou encore amine (-NH<sub>2</sub> ou -NH) par exemple.

Par ailleurs ces substances sont préférentiellement biocompatibles et ne donnent pas lieu à des métabolites toxiques ou dangereux pour l'organisme lors de leur dégradation par ce dernier.

On utilisera préférentiellement des dérivés d'acides aminés ou dérivés esters d'acides gras d'acides aminés tels que l'alanine, présentant à la fois une bonne biocompatibilité et un pouvoir organogélateur satisfaisant et surtout conférant au système gélifié des propriétés d'hystérèse. Ces propriétés se traduisent par un passage de l'état liquide à l'état gel à une température différente de celle observée lors du passage de la forme gel à la forme liquide

de ladite composition. La demanderesse a le mérite d'avoir remarqué que l'écart entre ces deux températures de transition est variable en fonction du type de liquide organique hydrophobe utilisé, et de la quantité de substance organogélatrice utilisée.

5        Ainsi, la demanderesse a réalisé des compositions conformes à l'invention dont les températures de transition et les écarts entre ces températures sont ajustables par simple modification de ces deux paramètres. Les résultats traduisant ces variations sont représentés sur les figures 1 à 7.

10        Préférentiellement, l'écart entre ces deux températures de transition est choisi pour que la température de transition liquide/gel soit inférieure à la température corporelle de l'organisme vivant considéré dans le cas où l'organogel est administré sans solvant organique hydrophile et que la température de transition gel/liquide soit supérieure à la susdite température.

15        Ainsi, on utilisera préférentiellement des dérivés d'alanine tels que le N-lauroyl L-alanine acide (LA) ou des dérivés esters de l'alanine tels que le N-lauroyl L-alanine méthyle ester (LAM), ou le N-lauroyl L-alanine éthyle ester (LAE), le N-stéaroyl L-alanine méthyle ester (LAM) ou le N-stéaroyl L-alanine éthyle ester (SAE) comme substance organogélatrice conforme à l'invention.

20        La quantité de substance organogélatrice est fonction du type de liquide organique hydrophobe employé et de la température de transition qu'on souhaite choisir pour l'organogel conforme à l'invention.

Cependant, la proportion de cette substance est avantageusement choisie entre 0,5 et 50 % en poids du poids total de ladite composition.

25        La demanderesse a constaté que l'utilisation comme substance organogélatrice du N-lauroyl L-alanine méthyle ester permet à ladite composition de passer à l'état gélifié par simple refroidissement sous le seuil de transition liquide/gel et de demeurer à l'état gel à une température dépassant la température de transition liquide/gel en particulier la température de l'organisme vivant.

30        En effet, la demanderesse a remarqué que ledit organogel formé par refroidissement est stable dans l'intervalle de températures comprises entre la température de transition liquide/gel et la température de transition gel/liquide.

L'ensemble de ces constatations a conduit la demanderesse à élaborer une composition thermosensible à propriétés gélifiantes ayant la capacité de passer sous forme gélifiée par simple refroidissement local et de conserver cet état gélifié à la température corporelle. Dans ce cas particulier de l'invention, la  
5 quantité de solvant organique hydrophile peut être extrêmement réduite, voire nulle puisque la gélification s'opère par un refroidissement de ladite composition et non plus par diffusion dudit solvant organique hydrophile.

Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux puisqu'il permet de s'affranchir de la présence du solvant organique hydrophile et donc de  
10 simplifier encore le procédé de préparation de la composition selon l'invention et également de diminuer son coût de revient.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, la composition thermosensible selon l'invention contient une proportion de N-lauroyl L-alanine méthyle ester suffisante pour permettre le passage de ladite composition de  
15 l'état liquide à l'état d'organogel par simple refroidissement de ladite composition au contact de son site d'injection dans l'organisme.

Un tel refroidissement doit être suffisant pour faire passer ladite composition, appliquée sous forme liquide, à sa forme gélifiée. Ce refroidissement qui peut être opéré par apposition externe d'un objet froid tel  
20 qu'un pain de glace ou une compresse froide ou tout autre moyen refroidissant autour du site d'injection, doit permettre un abaissement local, sous la température de transition liquide/gel de ladite composition.

La composition selon l'invention est donc préférentiellement sous forme liquide à la température du site d'application, possède une température de  
25 transition gel/liquide supérieure à la température corporelle et une température de transition liquide/gel inférieure à la température de l'organisme considéré ou de la zone d'implantation du gel. En effet, la température cutanée peut être inférieure de quelques degrés à la température générale de l'organisme.

Dans un mode de réalisation préféré, la proportion en N-lauroyl L-alanine méthyle ester de ladite composition est suffisante pour que la température de  
30 transition liquide/gel soit inférieure à la température corporelle (37°C en

général) et que la température de transition gel/liquide, soit supérieure à la température corporelle (37 °C en général).

D'une manière encore plus préférentielle, la composition selon l'invention doit comporter une température de transition liquide/gel inférieure à 30°C et une  
5 température de transition gel/liquide supérieure à + 35°C.

Ainsi, la composition selon l'invention est préférentiellement une composition dont l'intervalle entre la température de transition liquide/gel et la température de transition gel/liquide est avantageusement d'au moins 20°C, la température de transition liquide/gel étant préférentiellement comprise entre  
10 +5°C et + 36°C.

Le liquide organique hydrophobe de la composition selon la présente invention est un solvant organique hydrophobe ou un mélange de différents solvants organiques hydrophobes.

Les mélanges de différents solvants organiques hydrophobes présentent  
15 l'avantage de modifier le profil de gélification ou encore de faciliter la solubilisation de certaines substances bioactives.

Les solvants organiques hydrophobes utilisables pour la réalisation de la composition selon la présente invention appartiennent au groupe des solvants organiques non miscibles à l'eau capables de créer une structure de type  
20 organogel, en présence d'une quantité suffisante de substance dite organogélatrice telle que décrite ci-dessus.

Ces solvants sont préférentiellement biocompatibles, c'est-à-dire tolérés par l'organisme hôte, ne déclenchant pas ou peu de réaction immunitaire, de type inflammatoire ou allergique par exemple.

25 Enfin, on notera qu'il est préférable d'utiliser des solvants organiques hydrophobes liquides à température ambiante ce qui simplifie le procédé de fabrication et d'administration de la composition conforme à l'invention.

On utilisera préférentiellement des solvants organiques pouvant être dégradés de manière lente, c'est-à-dire, non rapidement métabolisés par les  
30 enzymes présentes sur le site d'injection, et notamment par les lipases.

Ainsi, les solvants organiques hydrophobes conformes à l'invention appartiennent au groupe comprenant les huiles végétales, les huiles semi-

synthétiques et certains esters d'acides gras, notamment du glycérol (en particulier biglycérides et triglycérides).

On peut ainsi envisager l'utilisation d'huiles végétales biocompatibles telles que l'huile de soja, l'huile de maïs, l'huile de coton, l'huile d'arachide, l'huile d'olive, l'huile de ricin, l'huile de sésame, l'huile d'amande, ou l'huile de carthame par exemple.

De façon préférentielle, on utilisera comme solvant organique hydrophobe une huile végétale telle que l'huile de soja présentant un comportement de gélification adéquat, une biodégradabilité lente et une excellente biocompatibilité.

Parmi les esters d'acides gras utilisables à titre de solvants organiques hydrophobes conformes à l'invention, on peut citer par exemple l'oléate d'éthyle ou le myristate d'isopropyle notamment.

Plus préférentiellement, on utilisera des esters d'acides gras du glycérol, notamment les triglycérides. Encore plus préférentiellement, on utilisera les triglycérides à chaîne moyenne (inférieure à 18 atomes de carbone) tels que le Labrafac CC® comportant deux acides gras de 8 et 10 atomes de carbone.

Parmi les solvants synthétiques ou semi-synthétiques utilisables comme solvants organiques hydrophobes conformément à la présente invention, on peut citer notamment le squalène, le benzoate de benzyle, le chlorure de benzyle, et les mélanges benzoate de benzyle/alcool benzylique ou le Crodamol® GTCC-PN.

On peut aussi combiner huiles et solvants organiques hydrophobes synthétiques.

On entend par solvant organique hydrophile selon l'invention, un solvant ayant une affinité importante pour les milieux aqueux, c'est-à-dire miscible à l'eau.

Le type de solvant organique hydrophile susceptible d'être utilisé dans la présente invention, est avantageusement un solvant capable d'agir comme agent de déstabilisation de l'organogel, c'est-à-dire susceptible de créer des liaisons faibles avec les molécules d'organogélateur. Un tel solvant est par ailleurs avantageusement biocompatible, c'est-à-dire toléré par l'organisme, de

telle sorte que sa diffusion n'entraîne pas ou peu de réaction immunitaire de type inflammatoire ou allergique. On utilisera donc de manière préférentielle pour la réalisation de la présente invention, un solvant ayant fait l'objet d'une approbation pour usage parentéral.

- 5           Ledit solvant organique hydrophile conforme à l'invention sera utilisé avantageusement dans des proportions inférieures à 60 % en poids de ladite composition, et plus préférentiellement inférieures à 20 %.

On peut citer parmi les solvants hydrophiles les solvants tels que les alcools comme l'éthanol, le glycérol, le propylène glycol, le poly(éthylène) glycol  
10 de faible poids moléculaire, l'alcool benzylique ou le chlorobutanol et leurs mélanges. Par ailleurs d'autres solvants miscibles à l'eau peuvent être envisagés, tels que le diméthyle sulfoxide (DMSO), le N-méthyl-pyrrolidone, le N-N-Diméthylacétamide, le furfural, le glycérol formal, l'isopropylidene glycérol, le lactate d'éthyle, l'acide acétique ou l'acide lactique et leurs mélanges.

- 15           Ces exemples ne sont pas limitatifs et on peut tout à fait concevoir de réaliser l'invention à partir d'autres composés organiques hydrophiles qui auraient des propriétés déstabilisatrices de gel, c'est-à-dire la capacité de créer des liaisons faibles avec la substance organogélatrice conforme à l'invention.

Les substances bioactives susceptibles d'être libérées dans l'organisme  
20 à partir de l'organogel conforme à la présente invention sont avantageusement des substances difficilement conditionnables pour une libération de façon prolongée telles que les molécules de faible poids moléculaire à caractère hydrophile ou très hydrophile. Avantageusement, ladite substance bioactive sera utilisée dans des proportions de 0,5 à 70 % en poids de la composition  
25 selon l'invention.

Ainsi, la demanderesse a testé le relargage à partir d'un organogel préformé de molécules de dextran marquées avec une molécule fluorescente : le FITC (Fluoro-Iso Thio Cyanate).

- Le profil de libération du dextran a été suivi *in vitro* sur 20 jours par  
30 dosage de la fluorescence comme le montre la figure N° 8. La fluorescence a été mesurée par des prélèvements réguliers d'une solution aqueuse de tampon phosphate salin.

Ainsi, on peut concevoir la libération sur des périodes supérieures à 3 jours de protéines notamment d'intérêt thérapeutique telles que l'interféron  $\alpha$ , l'interféron  $\beta$ , la somatostatine, la calcitonine, l'héparine, les interleukines ou l'erythropoïétine, de peptides, d'acides aminés ou de vitamines.

5 Ces exemples ne sont en aucun cas limitatifs et d'autres types de molécules, en particulier d'autres protéines peuvent tout à fait être envisagées pour une telle libération prolongée à partir d'un organogel conforme à l'invention.

10 On peut envisager le relargage dans l'organisme à partir de l'organogel selon l'invention, de molécules telles que certaines hormones et notamment certaines hormones peptidiques telles que l'hormone de croissance humaine, ou l'hormone thyroïdienne ou le leuprolide.

15 Ainsi, on peut prévoir d'utiliser la présente invention pour la libération prolongée dans l'organisme d'acides nucléiques, d'oligonucléotides ou de dérivés d'acides nucléiques notamment.

De même, on peut tout à fait concevoir de réaliser la présente invention dans le but de solubiliser puis de libérer de façon prolongée des substances bioactives hydrophobes, c'est-à-dire présentant une forte affinité pour l'organogel et une faible affinité pour le milieu aqueux environnant.

20 La présente invention est donc utilisable pour un grand nombre de substances à intérêt thérapeutique ou médical pour lesquelles on souhaite une libération prolongée dans l'organisme.

A titre d'exemple, la composition selon la présente invention peut être préparée de la manière suivante.

25

#### Cas d'un système de gélification par diffusion

On procède tout d'abord à la dissolution spontanée ou par chauffage et/ou agitation de l'organogélateur dans le solvant organique hydrophile.

30 Puis on incorpore la substance active et le (les) solvant(s) organique(s) hydrophobe(s) à ce mélange, deux cas peuvent alors se présenter :

a) Soit la substance active est soluble dans la phase organique ainsi formée :



Dans ce cas, on solubilise la substance active dans la phase organique formée. La solubilisation s'opère spontanément ou par chauffage, avec ou sans agitation.

On peut également prévoir dans ce cas la dissolution de ladite substance active directement dans le liquide organique hydrophobe.

b) Soit la substance active est peu ou pas soluble dans la phase organique :

Dans ce cas, on procède tout d'abord au "mouillage" de la substance active en la dispersant dans la phase organique formée par le solvant organique hydrophile et la substance organogélatrice. Après agitation, il se forme alors une suspension de substance active dans le mélange. Cette suspension pourra alors être ajoutée aux autres constituants de la composition selon la présente invention.

Il est aussi possible de dissoudre la substance active dans une quantité juste suffisante d'eau. Cette solution aqueuse de substance active va être ajoutée à la phase organique formée par le solvant organique hydrophile et la substance organogélatrice. On procède ensuite à l'émulsion de cette phase aqueuse dans la phase organique par agitation vive. Plus vive est l'agitation, plus petite est la taille des particules aqueuses formées dans la suspension organique et plus stable est l'émulsion. Cette émulsion va ensuite pouvoir être utilisée pour la préparation d'une composition conforme à l'invention.

Il est à noter, toutefois, que cette technique utilisant une émulsion, a l'avantage de conserver les molécules complexes de substance active dans un micro environnement aqueux, ce qui limite beaucoup les perturbations dont elles peuvent faire l'objet lorsqu'elles sont soumises au changement d'environnement, en particulier les possibilités de dénaturation de la substance.

On ajoute ensuite au mélange précédemment obtenu le liquide organique hydrophobe, éventuellement sous agitation et/ou chauffage modéré jusqu'à obtenir un mélange homogène.

Ce mélange homogène selon l'invention peut alors être injecté dans un organisme vivant par voie parentérale extra vasculaire à l'aide d'une seringue conventionnelle pour injections sous cutanées. Après un temps de latence qui

dépend de la formulation choisie, on assiste à la formation d'un durcissement sur le site d'injection, preuve de la formation *in vivo* de l'organogel selon l'invention.

5 S'il n'est pas extrait de manière chirurgicale, ledit organogel va, suivant sa taille et la nature des composants qui le constituent, être biodégradé et/ou s'éroder progressivement à plus ou moins longue échéance dans l'organisme. Cette biodégradation progressive va entraîner le relargage de la substance active éventuellement contenue dans l'organogel selon l'invention.

10 On choisira préférentiellement de réaliser de tels organogels dont la biodégradation sera comprise sur des périodes supérieures à 3 jours.

#### Cas d'un système de gélification par refroidissement

Dans ce cas, on mélange tout d'abord la substance organogélatrice dotée de propriétés d'hystérèse avec le liquide organique hydrophobe.

15 Puis on procède à l'incorporation de la substance active dans ce mélange. Si la substance active est organosoluble, elle sera dissoute dans le mélange directement ou par faible agitation. Dans le cas où la substance active est peu ou pas organosoluble, on procède comme précédemment à la dispersion de cette dernière dans la phase organique ou à la réalisation d'une émulsion stable de substance active préalablement dissoute dans l'eau, dans la  
20 phase organique formée.

La composition ainsi formée est stable et préférentiellement liquide à la température ambiante. Elle est injectée par exemple par voie parentérale extravasculaire.

25 Immédiatement après l'injection, un objet froid (ou tout autre système de refroidissement) est maintenu au contact du site d'injection pendant une durée suffisante pour permettre la gélification *in situ* de la composition selon la présente invention.

30 Lorsque la gélification est accomplie, le système de refroidissement est retiré. Le site d'injection regagne alors la température corporelle, l'organogel selon l'invention restant stable à ladite température.

La composition thermosensible à propriétés gélifiantes conforme à l'invention peut être utilisée par exemple à la délivrance retard de substances bioactives sur de longues périodes, c'est-à-dire sur des périodes d'au moins un jour jusqu'à une semaine, généralement supérieures à 3 jours. Cette  
5 composition peut donc servir de support à la délivrance retard de tout type de substances, notamment de substances à intérêt thérapeutique ou médical.

On peut ainsi prévoir l'utilisation de la composition thermosensible conforme à l'invention pour la délivrance retard de médicaments nécessitant d'être maintenu à un taux sanguin constant. Cette invention se révèle donc  
10 particulièrement intéressante pour les médicaments administrés ordinairement par plusieurs prises quotidiennes destinées à maintenir un taux thérapeutique efficace dans l'organisme.

On peut ainsi envisager l'utilisation de l'invention pour des substances thérapeutiques telles que la morphine ou les médicaments agissant comme  
15 régulateurs du système cardio-vasculaire ou du système nerveux.

De même, on peut concevoir l'utilisation de la composition selon l'invention dans le but de pallier certaines carences de l'organisme, notamment en vitamines ou en hormones. Ainsi, la présente invention peut servir de support à la délivrance prolongée d'hormones nécessitant une prise  
20 quotidienne, et encore aujourd'hui administrées par injection, mode d'administration douloureux et contraignant. Un tel support de libération par organogel, de par son administration aisée, son innocuité et son faible coût permettrait de s'affranchir de ces contraintes pour le patient.

Cette composition peut également être utilisée pour la fabrication d'un  
25 médicament destiné à être injecté dans l'organisme par voie parentérale extravasculaire et notamment par voie sous cutanée, intradermique, intrapéritonéale ou intramusculaire, par voie intra-oculaire ou intravasculaire, par voie vaginale, sur une plaie ouverte ou lors d'une intervention chirurgicale.

Elle peut par ailleurs permettre la fabrication d'un médicament destiné à  
30 être utilisé comme vecteur de libération prolongée de substance(s) bioactive(s) dans l'organisme.

## FIGURES

La figure 1 représente le diagramme des températures de transition Liquide-gel (lignes pleines) et Gel-liquide (lignes pointillées) du N-lauroyl L-Alanine Méthyle ester (LAM) en présence de benzoate de benzyle (cercles) ou d'un mélange benzoate de benzyle/ alcool benzylique à 5 % (triangles).

La figure 2 représente le diagramme des températures de transition Liquide-gel (lignes pleines) et Gel-liquide (lignes pointillées) du LAM en présence d'huile de soja (losanges) ou de Labrafac® CC (carrés).

La figure 3 représente le diagramme des températures de transition Liquide-gel (lignes pleines) et Gel-liquide (lignes pointillées) du N-lauroyl L-alanine éthyle ester (LAE) (triangles) en présence d'huile de soja.

La figure 4 représente le diagramme des températures de transition Liquide-gel (lignes pleines) et Gel-liquide (lignes pointillées) du LAM (carrés) et du N-stéaroyl L-alanine méthyle ester (SAM) (losanges) en présence d'oléate d'éthyle.

La figure 5 représente le diagramme des températures de transition Gel-liquide du LAM (carrés), LAE (triangles), SAM (cercles), N-stéaroyl L-alanine éthyle ester (SAE) (croix) et N-lauroyl L-alanine acide (LA) (losanges) dans l'huile de maïs.

Les figures 6 et 7 représentent les diagrammes des températures de transition Gel-liquide du LAM (carrés), LAE (triangles), SAM (cercles), SAE (croix) et LA (losanges) dans l'huile de carthame et le Crodamol® GTCC-PN (triglycérides) respectivement.

La figure 8 représente le suivi sur 20 jours du profil de libération in vitro du FITC-dextran (Poids moléculaire = 9500) à partir d'un gel constitué d'huile de soja et de 30 % de LAM dans le PBS à 37°C.

La figure 9 représente la photographie d'un implant conforme à l'exemple 5 au site d'injection.

**Exemple 1 : Formation d'un organogel *in vivo* à partir d'une composition conforme à l'invention.**

Dans cet exemple, on cherche à vérifier que la composition conforme à l'invention est bien capable de gélifier *in vivo*. Les essais sont réalisés sur le rat.

On utilise comme solvant organique hydrophobe conforme à l'invention, l'huile de soja et l'éthanol comme solvant organique hydrophile selon l'invention.

La substance organogélatrice choisie est le LAM (N-lauroyl L-alanine méthyle ester).

Les proportions utilisées sont récapitulées dans le tableau suivant :

Produit	Fonction	Proportions
LAM	Organogélateur	20% p/v
Huile de soja	Solvant organique hydrophobe	qsp 100 mL
Ethanol	Solvant organique hydrophile	14 % v/v

On procède tout d'abord à la dissolution de l'organogélateur dans l'éthanol. Puis on rajoute à ce mélange l'huile de soja. Le mélange ainsi obtenu est agité et chauffé jusqu'à homogénéisation complète. Ce mélange reste stable et liquide à température ambiante.

On procède ensuite à l'injection sous cutanée de la composition ainsi obtenue. L'injection est pratiquée au niveau dorsal, à l'aide d'une seringue conventionnelle pour l'injection en sous cutané. Après 2 heures l'animal est sacrifié et un gel est extrait du site d'injection, démontrant la formation *in vivo* de l'organogel.

## **Exemple 2 : Formation d'un organogel *in vivo* à partir d'une composition conforme à l'invention.**

On utilise comme solvant organique hydrophobe conforme à l'invention, l'huile de soja et l'éthanol comme solvant organique hydrophile selon l'invention.

La substance organogélatrice choisie est le LAM (N-lauroyl, L-alanine méthyle ester)

Les proportions utilisées sont récapitulées dans le tableau suivant :

Produit	Fonction	Proportions
LAM	Organogélateur	30% p/v
Huile de soja	Solvant organique hydrophobe	qsp 100 mL
Ethanol	Solvant organique hydrophile	18% v/v

Le procédé d'injection est identique à celui de l'exemple 1, de même que l'apparition d'un organogel 2h30 post-injection.

5

### Exemple 3 : Fabrication d'une composition selon l'invention contenant du FITC-Dextran

Cette composition permet de mesurer in vitro le relargage progressif d'une substance active contenue dans un organogel préformé.

10

On utilise comme principe actif le FITC-dextran qui va permettre de mesurer par dosage de la fluorescence associée, la quantité de dextran libérée par l'organogel conforme à l'invention.

Voir la figure 8.

15

Chaque point représente la valeur moyenne  $\pm$ sd (n=3). La surface du gel exposé était de 0.64 mm<sup>2</sup>.

Produit	Fonction	Proportions
FITC-Dextran	Substance active	1,3% p/p
LAM	Organogélateur	30% p/v
Huile de soja	Solvant organique hydrophobe	qsp 100 mL

20

On procède tout d'abord à la dissolution à chaud du LAM dans l'huile de soja. Puis on disperse à chaud le FITC-dextran dans la phase organique formée après l'avoir préalablement broyé au mortier, jusqu'à l'obtention d'une composition liquide homogène.

Ce mélange liquide est ensuite introduit gélifié par refroidissement dans un tube à essai. On ajoute sur le gel une solution aqueuse saline de tampon phosphate salin.

On prélève ensuite sur une période de 20 jours, des échantillons du liquide environnant l'organogel conforme à l'invention. On peut alors doser la fluorescence émise par ces échantillons et ainsi constater la libération prolongée du FITC-Dextran dans le milieu environnant. Dans l'hypothèse où un tel gel serait administré *in vivo* et conformément à la présente invention, un solvant organique du type éthanol devrait être rajouté de façon à inhiber le processus de gélification avant l'injection.

Les résultats de ce dosage sont récapitulés sur la figure N° 8.

**Exemple 4 : Mise en évidence *in vivo* des propriétés hystérétiques d'un organogel conforme à l'invention. Exemple de gélification sans solvant hydrophile.**

La solution organogélifiante est préparée à partir des constituants suivants :

Produit	Fonction	Proportions
LAM	Organogélateur	40% p/v
Benzyl benzoate/5% alcool benzylique	Solvant organique hydrophobe	qsp 100 mL

Les propriétés hystérétiques de cet organogel ont préalablement été déterminées pour que la température de transition liquide/gel soit inférieure à 30°C et que la température de transition gel/liquide soit supérieure à 37°C.

La solution organogélifiante est tout d'abord amenée à l'état liquide par chauffage, puis un volume de 180 µL de cette solution revenue à température ambiante est injecté en sous cutané chez le rat. Une fois l'injection terminée, une compresse à 4°C est apposée sur le site d'injection pendant 3 minutes, afin d'y abaisser la température et de provoquer la gélification.

L'animal est sacrifié 2h30 après l'injection et une observation visuelle de la forme de l'implant est effectuée. Puis l'implant est extrait du site d'injection et pesé.

Dans cette expérimentation, l'implant avait une forme discoïdale d'environ 1 cm de diamètre et un poids de 130 mg.

**Exemple 5 : Formation d'un organogel *in vivo* à partir d'une matrice constituée d'un mélange de solvants organiques hydrophobes**

Dans cet exemple, on souhaite vérifier la capacité de l'organogélateur à gélifier *in vivo* un organogel constitué d'un mélange de solvants organiques hydrophobes. Les essais sont réalisés chez le rat.

On utilise comme solvants organiques hydrophobes conformes à l'invention : l'huile de soja et l'oléate d'éthyle et l'éthanol comme solvant hydrophile.

La substance organogélatrice choisie est le LAM (N-lauroyl L-alanine méthyle ester).

La substance bioactive choisie est l'acétate de leuprolide. Une solution aqueuse d'acétate de Leuprolide à 0.67 %p/v est réalisée dans un premier temps.

Les proportions utilisées sont résumées dans le tableau suivant :

Produit	Fonction	Proportion
LAM	Organogélateur	20% p/v
Éthanol	Solvant organique hydrophile	12% v/v
Solution d'acétate de leuprolide 0.67 %p/v	phase dispersée contenant la substance bioactive	8% v/v
Huile de soja/Oléate d'éthyle (50:50 v/v)	solvant organique hydrophobe	qsp 100 mL

15

On procède tout d'abord à la dissolution à chaud de l'organogélateur dans le mélange d'huile de soja et d'oléate d'éthyle. Puis on rajoute l'éthanol à ce mélange. Le mélange ainsi obtenu est agité et chauffé jusqu'à homogénéisation complète. Ce mélange reste stable et liquide à température ambiante. L'acétate de leuprolide est dissous dans l'eau distillée puis ajouté au mélange liquide. Ce mélange est agité puis émulsifié aux ultrasons pendant deux minutes.

20



On procède ensuite à l'injection sous cutanée de la composition ainsi obtenue. L'injection est pratiquée au niveau dorsal chez le rat à l'aide d'une seringue conventionnelle pour l'injection en sous cutané. Après 2 heures, l'animal est sacrifié et un gel est extrait du site d'injection, démontrant la formation *in vivo* de l'organogel constitué d'un mélange de solvants organiques hydrophobes. La figure 9 présente la forme de l'implant, obtenu selon la composition décrite dans cet exemple, au site d'injection.

**Exemple 6 : Formation d'une émulsion contenant une substance bioactive à inclure dans la composition conforme à l'invention**

On cherche à concevoir une émulsion stable d'eau dans l'huile (E/H) qui renferme une substance bioactive hydrophile telle l'acétate de leuprolide en solution dans la phase aqueuse (phase dispersée).

La substance bioactive choisie est l'acétate de leuprolide. Elle est dissoute dans l'eau dans une proportion de 7.62% p/v.

L'émulsion est stabilisée par deux tensioactifs, le polysorbate 20 (Tween 20) et le trioléate de sorbitan (Span 85), dont la proportion de chacun est ajustée en fonction de la balance hydrophile/hydrophobe de l'émulsion à concevoir.

Les proportions utilisées sont récapitulées dans le tableau suivant :

Produit	Proportion (v/v)
Solution d'acétate de leuprolide 7.62% p/v	12.2%
Solution à 10% p/v Tween 20 dans eau	7.8%
Solution à 10% p/v Span 85 dans huile de soja	2.2%
Huile de soja	77.8%

On prépare une solution à 10% p/v de Span 85 dans l'huile de soja et une solution de 10 %p/v de Tween 20 dans l'eau. Les différentes phases sont ensuite rassemblées et le mélange est agité et chauffé jusqu'à

homogénéisation complète. Ce mélange reste stable et liquide à température ambiante et peut être ajouté directement à un mélange d'huiles, d'organogélateur et de N,N-diméthylacétamide (DMAc) (voir exemple 7).

5 **Exemple 7 : Formation d'un organogel *in vitro* à partir d'une composition contenant une émulsion et un solvant organique hydrophile autre que l'éthanol**

Dans cet exemple, on cherche à vérifier la capacité d'un solvant organique hydrophile autre que l'éthanol à inhiber la gélification de l'organogel à  
10 température ambiante.

On utilise comme solvant organique hydrophobe l'huile de soja et le N,N-diméthylacétamide (DMAc) comme solvant organique hydrophile.

La substance organogélatrice choisie est le LAM (N-lauroyl L-alanine méthyle ester).

15 Les proportions utilisées sont récapitulées dans le tableau suivant :

Produit	Fonction	Proportion
LAM	Organogélateur	18.4% p/v
N,N-diméthylacétamide	Solvant organique hydrophile	18.4% v/v
Émulsion E/H	Véhicule de la substance bioactive	8.2% v/v
Huile de soja	Solvant organique hydrophobe	qsp 100 mL

On procède tout d'abord à la dissolution à chaud de l'organogélateur dans l'huile de soja. Puis on rajoute le DMAc à ce mélange. Le mélange ainsi obtenu est agité et chauffé puis l'émulsion est ajoutée et le mélange est agité  
20 jusqu'à homogénéisation complète. Ce mélange reste stable, et est visqueux à température ambiante (semblable à une crème) et peut être injecté comme tel à l'aide d'une seringue conventionnelle en sous cutané. Le gel se forme suite à l'injection de cette préparation visqueuse.

### Revendications

**1. Composition thermosensible sous forme liquide contenant**

- un liquide organique hydrophobe,
- 5       - une substance organogélatrice dont les molécules ont la capacité de se lier entre elles par liaisons de faible énergie, et
- une substance bioactive,

qui passe sous forme d'organogel lorsqu'elle entre en contact avec un liquide physiologique, lors de son administration à un corps animal, en particulier  
10 l'homme.

**2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la formation de l'organogel se fait par refroidissement du site d'application de ladite composition.**

**3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle**  
15 **contient en outre un solvant organique hydrophile capable de créer des liaisons faibles avec la substance organogélatrice, et que la formation de l'organogel se fait par diffusion dudit solvant organique hydrophile vers le milieu aqueux.**

**4. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit organogel possède une température de transition de l'état liquide à l'état gel**  
20 **inférieure à la température du site d'application dans le cas où l'organogel est administré sans solvant organique hydrophile et une température de transition de l'état gel à l'état liquide supérieure à la température corporelle.**

**5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit organogel possède une température de transition de l'état liquide à l'état gel inférieure à**  
25 **30 °C et une température de transition de l'état gel à l'état liquide supérieure à + 35°C.**

**6. Composition selon l'une des revendications 3 à 5 caractérisée en ce que la proportion du solvant organique hydrophile est inférieure à 60 %, et préférentiellement inférieure à 20 % en poids de ladite composition.**

30 **7. Composition selon l'une des revendications 3 à 6 caractérisée en ce que ledit solvant organique hydrophile appartient au groupe comprenant l'éthanol, le glycérol, l'alcool benzylique, le propylène glycol, le N-méthylpyrrolidone et le**

diméthylsulfoxyde (DMSO), le poly(éthylène) glycol de faible poids moléculaire, le chlorobutanol, le furfural, le N-N-diméthylacétamide, le glycérol formol, l'isopropylidène glycérol, le lactate d'éthyle, l'acide acétique et l'acide lactique.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit solvant  
5 organique hydrophile est l'éthanol.

9. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit liquide organique hydrophobe appartient au groupe comprenant les huiles végétales, les triglycérides, les huiles semi-synthétiques, et les solvants organiques non miscibles à l'eau.

10 10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit liquide organique hydrophobe comprend l'huile de soja, le squalène, le benzoate de benzyle, un triglycéride, ou un mélange de benzoate de benzyle et d'alcool benzylique.

11. Composition selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit  
15 liquide organique hydrophobe est un mélange de différents solvants organiques hydrophobes.

12. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que ledit mélange est un mélange d'huile de soja et d'oléate d'éthyle.

13. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce  
20 que ladite substance biologiquement active appartient au groupe comprenant les protéines, les peptides, les acides aminés, les vitamines, les acides nucléiques et les oligonucléotides.

14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi la morphine, l'interféron  $\alpha$ ,  
25 l'interféron  $\beta$ , la somatostatine, l'héparine, les interleukines, l'érythropoïétine, la calcitonine, l'hormone de croissance humaine, l'hormone thyroïdienne, le leuprolide.

15. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la substance organogélatrice représente entre 0,5 et 50 % en poids du  
30 poids total de ladite composition.

16. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la substance organogélatrice est une molécule de faible poids moléculaire

présentant des extrémités acide, alcool ou amine, notamment un dérivé d'acides aminés.

**17.** Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que la substance organogélatrice appartient au groupe des dérivés esters de l'alanine.

5    **18.** Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite substance organogélatrice est le N-lauroyl L-alanine méthyle ester ou N-lauroyl L-alanine éthyle ester.

10    **19.** Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite substance organogélatrice est le N-stéaroyl L-alanine méthyle ester ou le N-stéaroyl L-alanine éthyle ester.

**20.** Organogel obtenu à partir de la composition selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'il reste sous forme gélifiée stable entre la température d'application et la température de transition gel/liquide de ladite composition.

15    **21.** Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 20 pour la fabrication d'un médicament destiné à être injecté dans l'organisme par voie parentérale extravasculaire et notamment par voie sous cutanée, intradermique, intrapéritonéale ou intramusculaire, ou destiné à être administré par voie intra-oculaire ou par voie vaginale, sur une plaie ouverte ou lors d'une  
20    intervention chirurgicale.

**22.** Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 20 pour la fabrication d'un médicament destiné à être utilisé comme vecteur de libération prolongée de substance(s) bioactive(s) dans l'organisme.

25    **21.** Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 1, caractérisé en ce que la substance bioactive, éventuellement en solution aqueuse, est ajoutée au mélange constitué de la substance organogélatrice et du liquide organique hydrophobe.

**22.** Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 3 qui consiste à

30    - dissoudre la substance organogélatrice dans le solvant organique hydrophile, puis à incorporer la substance bioactive et le liquide organique hydrophobe.

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que lorsque la substance bioactive est peu soluble ou pas soluble dans la phase organique, une solution aqueuse de ladite substance est dispersée sous agitation dans la phase organique constituée de la substance organogélatrice et du solvant  
s organique hydrophile.

## REVENDICATIONS MODIFIEES

[Reçues par le Bureau international le 11 octobre 2003 (11.10.03):  
revendications 22-23 remplacées par revendications 22-25 (pages 28 et 29)]

présentant des extrémités acide, alcool ou amine, notamment un dérivé d'acides aminés.

**17.** Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que la substance organogélatrice appartient au groupe des dérivés esters de l'alanine.

5 **18.** Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite substance organogélatrice est le N-lauroyl L-alanine méthyle ester ou N-lauroyl L-alanine éthyle ester.

**19.** Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite substance organogélatrice est le N-stéaroyl L-alanine méthyle ester ou le N-  
10 stéaroyl L-alanine éthyle ester.

**20.** Organogel obtenu à partir de la composition selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'il reste sous forme gélifiée stable entre la température d'application et la température de transition gel/liquide de ladite composition.

15 **21.** Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 20 pour la fabrication d'un médicament destiné à être injecté dans l'organisme par voie parentérale extravasculaire et notamment par voie sous cutanée, intradermique, intrapéritonéale ou intramusculaire, ou destiné à être administré par voie intra-oculaire ou par voie vaginale, sur une plaie ouverte ou lors d'une  
20 intervention chirurgicale.

**22.** Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 20 pour la fabrication d'un médicament destiné à être utilisé comme vecteur de libération prolongée de substance(s) bioactive(s) dans l'organisme.

**23.** Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 1,  
25 caractérisé en ce que la substance bioactive, éventuellement en solution aqueuse, est ajoutée au mélange constitué de la substance organogélatrice et du solvant organique hydrophobe.

**24.** Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 3 qui consiste à

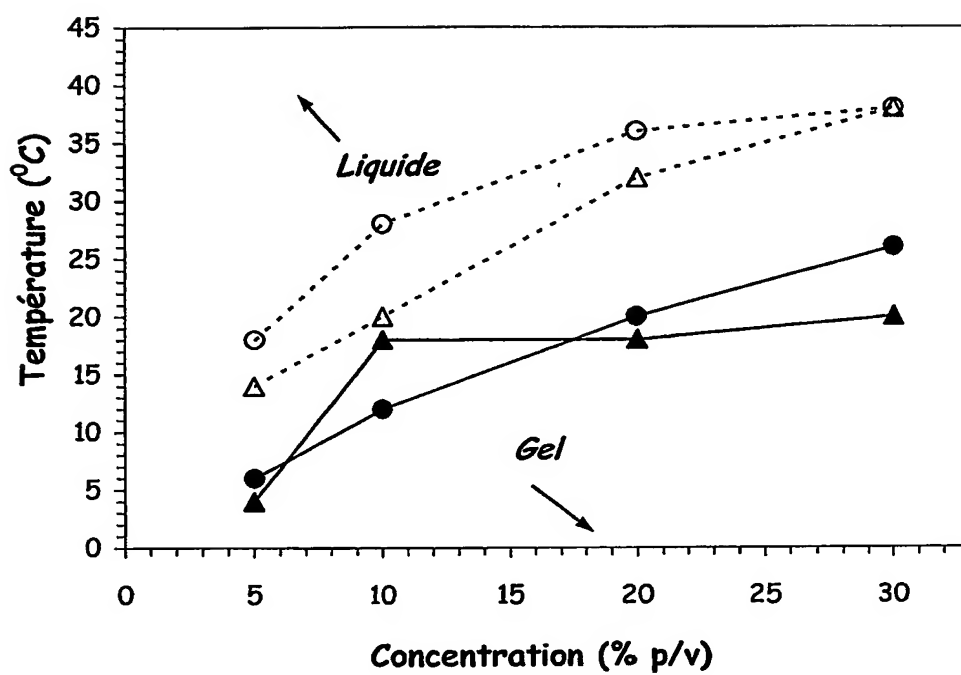
30 - dissoudre la substance organogélatrice dans le solvant organique hydrophile, puis à incorporer la substance bioactive et le solvant organique hydrophobe.

25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que lorsque la substance bioactive est peu soluble ou pas soluble dans la phase organique, une solution aqueuse de ladite substance est dispersée sous agitation dans la phase organique constituée de la substance organogélatrice et du solvant
- 5 organique hydrophile.



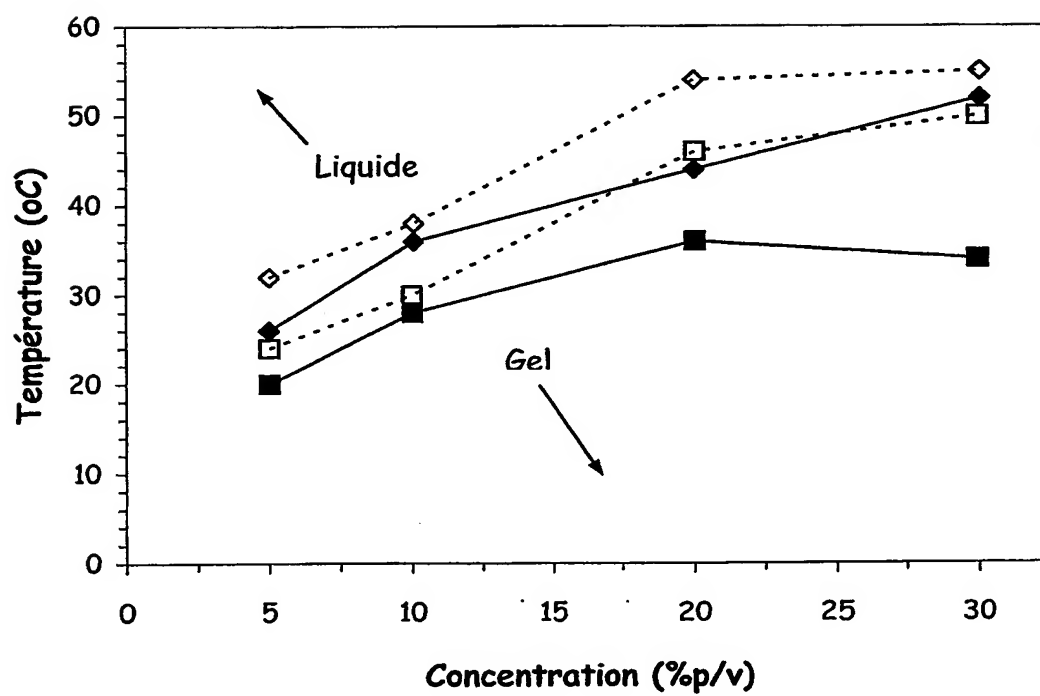
1/9

FIGURE 1



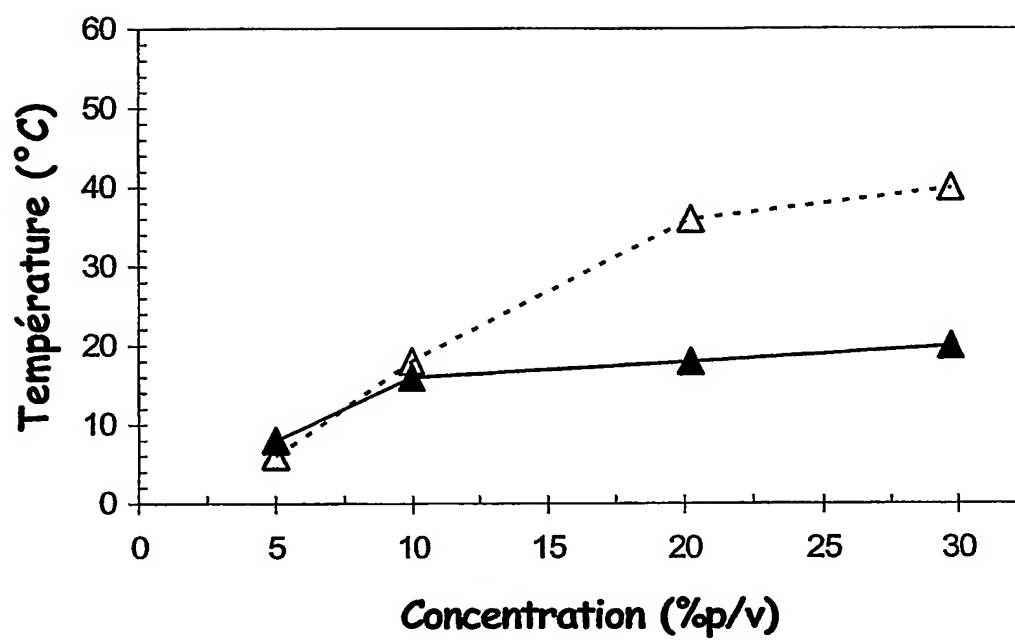
2/9

FIGURE 2



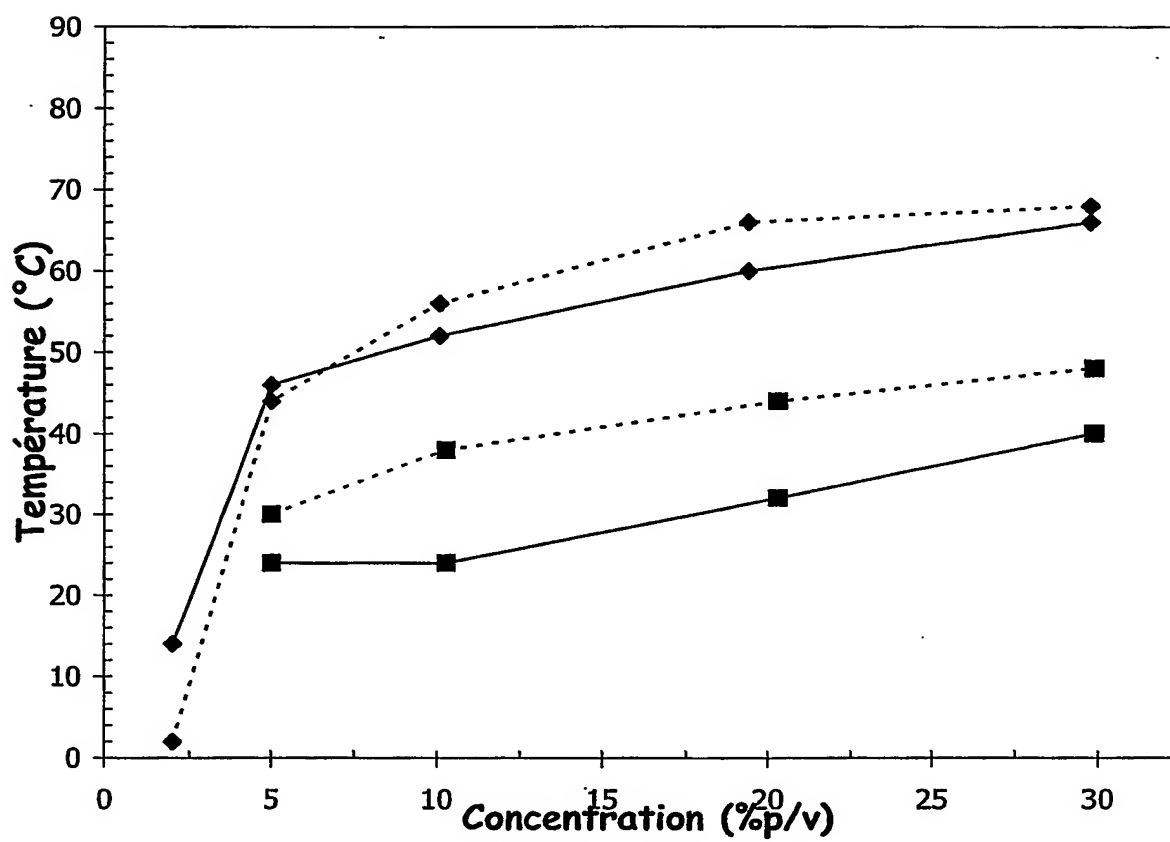
3/9

FIGURE 3



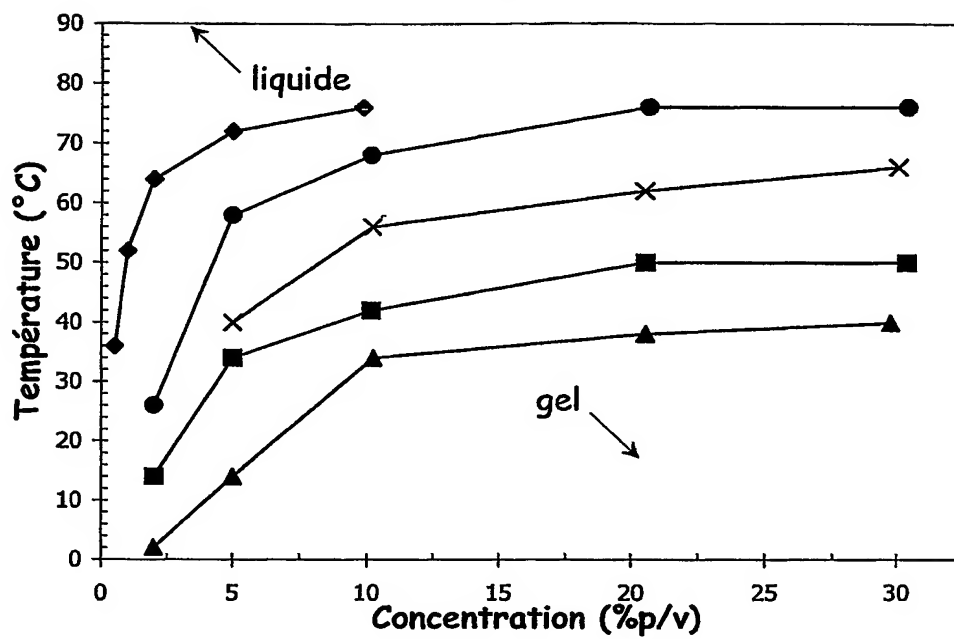
4/9

FIGURE 4



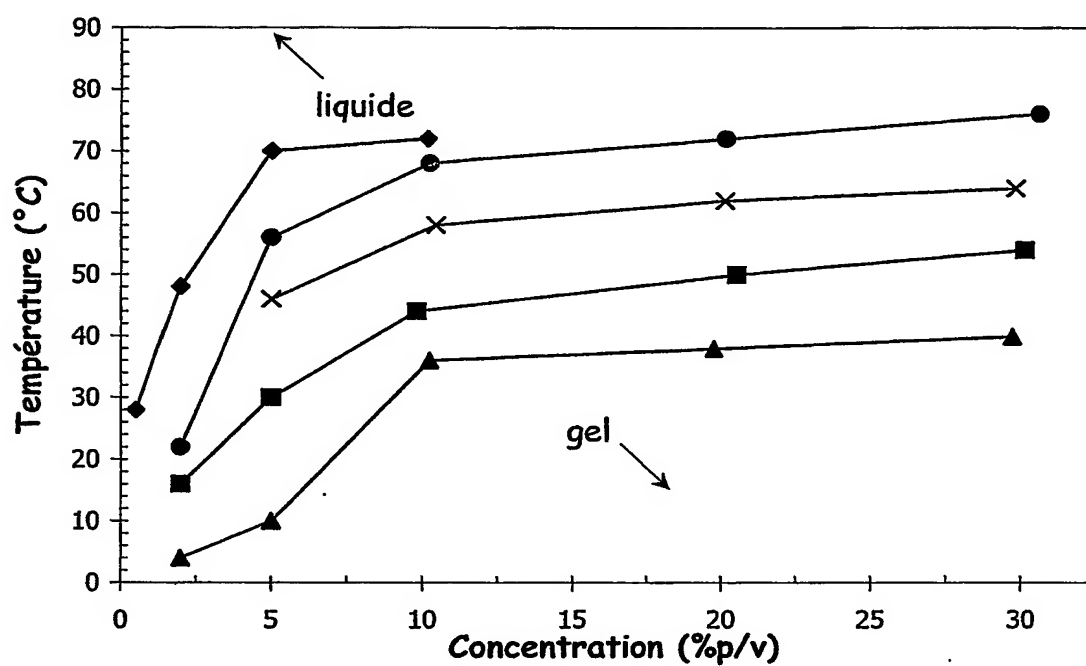
5/9

FIGURE 5



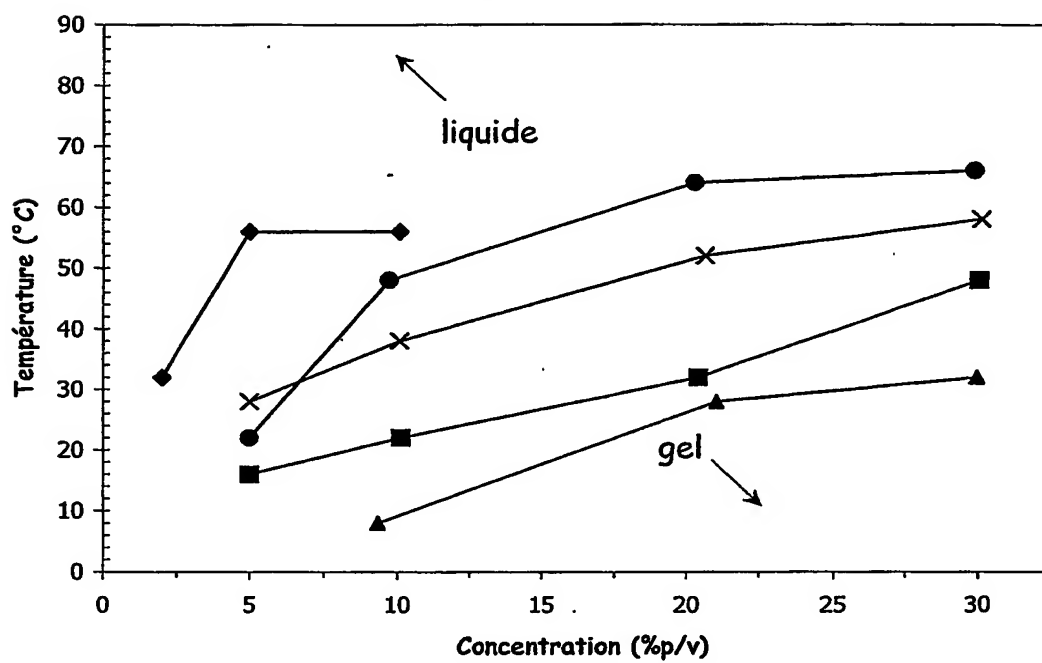
6/9

FIGURE 6



7/9

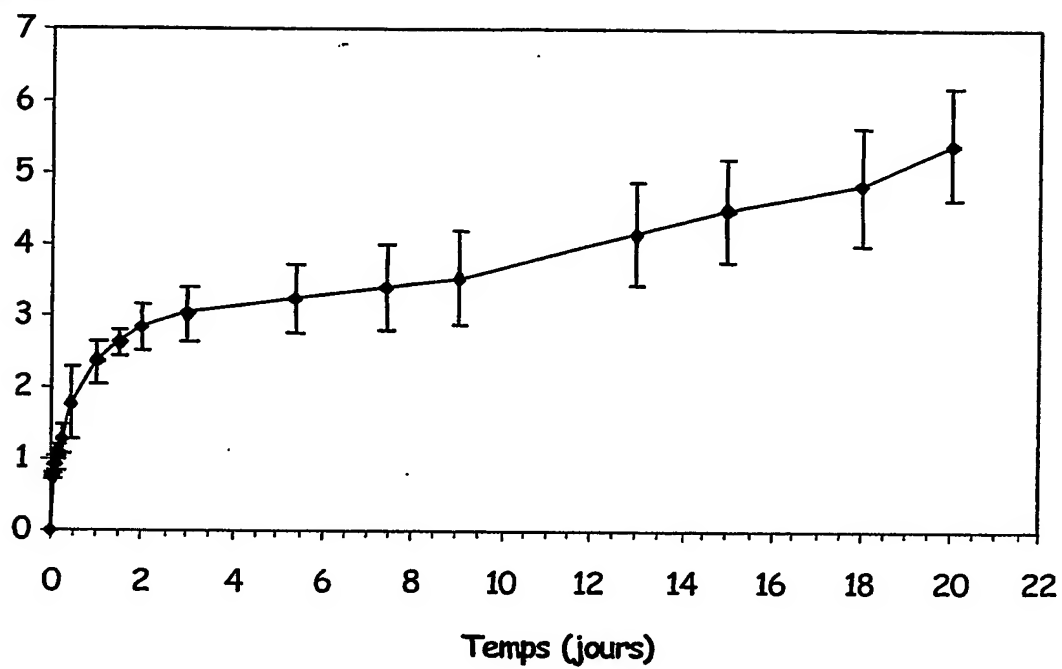
FIGURE 7



8/9

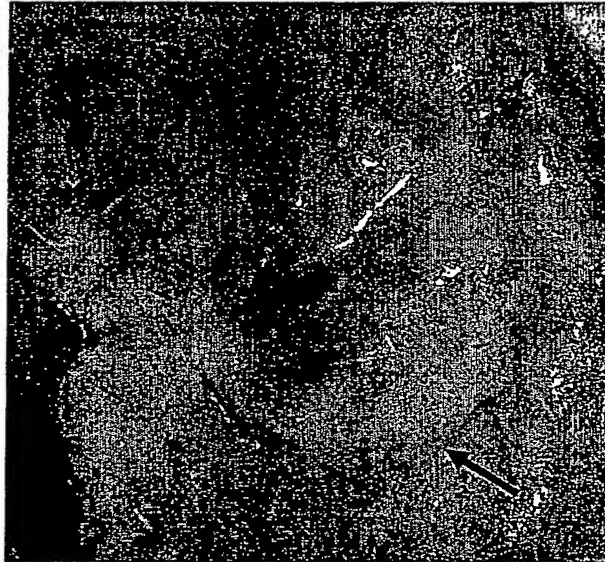
FIGURE 8

Libération (%)





**FIGURE 9/9**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00797

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K9/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 56725 A (UCB, S.A.) 11 November 1999 (1999-11-11)	1,3,6-8, 13-16, 20-24
Y	the whole document page 8, line 15 - line 24 ---	1,16-19
X	WO 99 13913 A (SOUTHERN BIOSYSTEMS, INC.) 25 March 1999 (1999-03-25)  page 3, line 11 -page 4, line 21 page 14, line 1 - line 9 page 14, line 21 -page 15, line 14 claims 1-12 ---	1,3,6-9, 13-16, 20-24
X	EP 1 063 007 A (L'ORÉAL) 27 December 2000 (2000-12-27) page 7; example 1 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the International filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 2003

Date of mailing of the international search report

21/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/AR 03/00797

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MURDAN S ET AL: "NOVEL SORBITAN MONOSTEARATE ORGANOGELS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. WASHINGTON, US, vol. 88, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 608-614, XP000825429 ISSN: 0022-3549 page 608	1-25
Y	FR 2 281 162 A (AJINOMOTO CO., LTD.) 5 March 1976 (1976-03-05) page 1, line 1 -page 2, line 29 page 5, line 9 -page 6, line 22 page 7, line 3	1, 16-19
A	X. LUO ET AL.: "Self-assembled organogels formed by mono-chain L-alanine derivatives" CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 2001, no. 17, 7 September 2001 (2001-09-07), pages 1556-1557, XP002220130 Cambridge (GB) the whole document	1-25
A	S. BHATTACHARYA ET AL.: "First report of phase selective gelation of oil from oil/water mixtures. Possible implications toward containing oil spills" CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 2001, no. 2, 21 January 2001 (2001-01-21), pages 185-186, XP002220131 Royal society of chemistry (GB) the whole document	1-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP03/00797

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9956725	A	11-11-1999	BE 1011899 A6 01-02-2000
			AT 219659 T 15-07-2002
			AU 3708599 A 23-11-1999
			AU 738455 B2 20-09-2001
			AU 4030899 A 23-11-1999
			BG 104872 A 31-07-2001
			BR 9910066 A 26-12-2000
			CA 2330500 A1 11-11-1999
			CN 1301147 T 27-06-2001
			DE 69901951 D1 01-08-2002
			DE 69901951 T2 28-11-2002
			EA 2530 B1 27-06-2002
			WO 9956725 A1 11-11-1999
			WO 9956726 A1 11-11-1999
			EP 1073414 A1 07-02-2001
			EP 1073415 A1 07-02-2001
			ES 2178430 T3 16-12-2002
			HU 0101580 A2 28-03-2002
			JP 2002513748 T 14-05-2002
			JP 2002513749 T 14-05-2002
			NO 20005431 A 19-12-2000
			NZ 507707 A 31-05-2002
			TR 200003158 T2 21-03-2001
			US 6464987 B1 15-10-2002
			US 6471970 B1 29-10-2002
WO 9913913	A	25-03-1999	US 5968542 A 19-10-1999
			AU 9475098 A 05-04-1999
			BR 9812313 A 12-09-2000
			CA 2303442 A1 25-03-1999
			CN 1299290 T 13-06-2001
			EP 1015032 A2 05-07-2000
			JP 2001516728 T 02-10-2001
			WO 9913913 A2 25-03-1999
			US 6413536 B1 02-07-2002
EP 1063007	A	27-12-2000	FR 2794998 A1 22-12-2000
			EP 1063007 A1 27-12-2000
			JP 2001055308 A 27-02-2001
FR 2281162	A	05-03-1976	JP 934597 C 30-11-1978
			JP 51125677 A 02-11-1976
			JP 53013434 B 10-05-1978
			JP 944725 C 20-03-1979
			JP 51019139 A 16-02-1976
			JP 53027776 B 10-08-1978
			FR 2281162 A1 05-03-1976
			US 3969087 A 13-07-1976

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/EP 03/00797

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 A61K9/06

Selon la classification Internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 56725 A (UCB, S.A.) 11 novembre 1999 (1999-11-11)	1,3,6-8, 13-16, 20-24
Y	le document en entier page 8, ligne 15 - ligne 24 ---	1,16-19
X	WO 99 13913 A (SOUTHERN BIOSYSTEMS, INC.) 25 mars 1999 (1999-03-25)  page 3, ligne 11 -page 4, ligne 21 page 14, ligne 1 - ligne 9 page 14, ligne 21 -page 15, ligne 14 revendications 1-12 ---	1,3,6-9, 13-16, 20-24
X	EP 1 063 007 A (L'ORÉAL) 27 décembre 2000 (2000-12-27) page 7; exemple 1 ---	1
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 juillet 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/07/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/00797

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MURDAN S ET AL: "NOVEL SORBITAN MONOSTEARATE ORGANOGELS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. WASHINGTON, US, vol. 88, no. 6, juin 1999 (1999-06), pages 608-614, XP000825429 ISSN: 0022-3549 page 608</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-25
Y	<p>FR 2 281 162 A (AJINOMOTO CO., LTD.) 5 mars 1976 (1976-03-05) page 1, ligne 1 -page 2, ligne 29 page 5, ligne 9 -page 6, ligne 22 page 7, ligne 3</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1, 16-19
A	<p>X. LUO ET AL.: "Self-assembled organogels formed by mono-chain L-alanine derivatives" CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 2001, no. 17, 7 septembre 2001 (2001-09-07), pages 1556-1557, XP002220130 Cambridge (GB) le document en entier</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-25
A	<p>S. BHATTACHARYA ET AL.: "First report of phase selective gelation of oil from oil/water mixtures. Possible implications toward containing oil spills" CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 2001, no. 2, 21 janvier 2001 (2001-01-21), pages 185-186, XP002220131 Royal society of chemistry (GB) le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR/03/00797

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9956725	A	11-11-1999	BE 1011899 A6 01-02-2000
			AT 219659 T 15-07-2002
			AU 3708599 A 23-11-1999
			AU 738455 B2 20-09-2001
			AU 4030899 A 23-11-1999
			BG 104872 A 31-07-2001
			BR 9910066 A 26-12-2000
			CA 2330500 A1 11-11-1999
			CN 1301147 T 27-06-2001
			DE 69901951 D1 01-08-2002
			DE 69901951 T2 28-11-2002
			EA 2530 B1 27-06-2002
			WO 9956725 A1 11-11-1999
			WO 9956726 A1 11-11-1999
			EP 1073414 A1 07-02-2001
			EP 1073415 A1 07-02-2001
			ES 2178430 T3 16-12-2002
			HU 0101580 A2 28-03-2002
			JP 2002513748 T 14-05-2002
			JP 2002513749 T 14-05-2002
			NO 20005431 A 19-12-2000
			NZ 507707 A 31-05-2002
			TR 200003158 T2 21-03-2001
			US 6464987 B1 15-10-2002
			US 6471970 B1 29-10-2002
WO 9913913	A	25-03-1999	US 5968542 A 19-10-1999
			AU 9475098 A 05-04-1999
			BR 9812313 A 12-09-2000
			CA 2303442 A1 25-03-1999
			CN 1299290 T 13-06-2001
			EP 1015032 A2 05-07-2000
			JP 2001516728 T 02-10-2001
			WO 9913913 A2 25-03-1999
			US 6413536 B1 02-07-2002
EP 1063007	A	27-12-2000	FR 2794998 A1 22-12-2000
			EP 1063007 A1 27-12-2000
			JP 2001055308 A 27-02-2001
FR 2281162	A	05-03-1976	JP 934597 C 30-11-1978
			JP 51125677 A 02-11-1976
			JP 53013434 B 10-05-1978
			JP 944725 C 20-03-1979
			JP 51019139 A 16-02-1976
			JP 53027776 B 10-08-1978
			FR 2281162 A1 05-03-1976
			US 3969087 A 13-07-1976

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**